

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-266747

(43)Date of publication of application : 29.09.2000

(51)Int.Cl.

G01N 33/53

(21)Application number : 11-073276

(71)Applicant : MORINAGA & CO LTD

(22)Date of filing : 18.03.1999

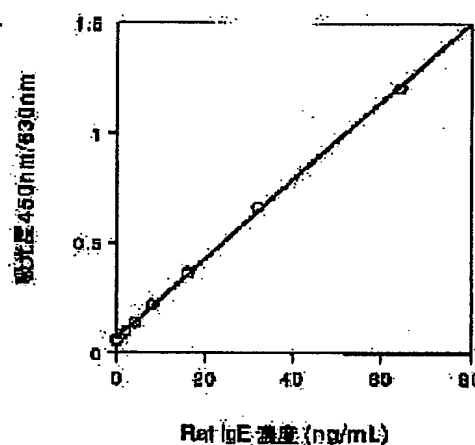
(72)Inventor : HONJO TSUTOMU
MAMEKOSHI SHINICHI

(54) RAT IgE MEASURING KIT USING ANTI-RAT IgE ANTIBODY AND MEASURING METHOD

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To measure rat IgE in an objective sample by using an antibody (a combination of a polyclonal antibody and a monoclonal antibody) recognizing at least a part of the rat IgE.

SOLUTION: Any antibody recognizing rat IgE as an antigen can be used. Therefore, either of a polyclonal antibody and a monoclonal antibody may be used as an antibody. When a polyclonal antibody is used as a solid phase antibody, a polyclonal antibody specifically refined by means of a column with an immobilized purified rat IgE is preferable for suppressing a nonspecific action of the antibody. For providing a high measurement sensitiveness, an antibody F(aa')₂ is used as a labeled antibody desirably. For example, in measurement performing a two-step antigen-antibody reaction such as a solid phase sandwich method, as a primary antibody used for coating a carrier, a polyclonal antibody or a monoclonal antibody is used, while two or more kinds of antibodies are used as labeled secondary antibodies.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

09.12.2005

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2000-266747
(P2000-266747A)

(43) 公開日 平成12年9月29日 (2000.9.29)

(51) Int.Cl.
G 0 1 N 33/53

識別記号

F I
G 0 1 N 33/53

テームト* (参考)

N
Q

審査請求 未請求 請求項の数13 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願平11-73276

(22) 出願日 平成11年3月18日 (1999.3.18)

(71) 出願人 000006116

森永製菓株式会社
東京都港区芝5丁目33番1号

(72) 発明者 本庄 勉

神奈川県横浜市鶴見区下末吉2-1-1
株式会社森永生科学研究所内

(72) 発明者 豆越 慎一

神奈川県横浜市鶴見区下末吉2-1-1
株式会社森永生科学研究所内

(74) 代理人 100100181

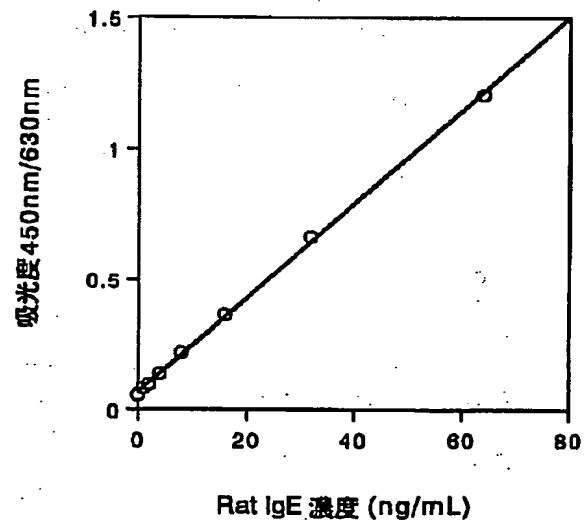
弁理士 阿部 正博

(54) 【発明の名称】 抗ラットIgE抗体を用いたラットIgEの測定キット及び測定方法

(57) 【要約】

【課題】 ラットを用いたアレルギー感作による血中または細胞培養上清のIgE濃度の測定は、動物実験における各種アレルギー疾患の病勢や薬剤による治療効果、および予知、診断に有用な情報を提供する。

【解決手段】 ラットIgEの少なくとも一部を認識する抗体を含む、対象試料中のラットIgEを簡便かつ高感度に測定するためのキット、及び該測定キットを使用する測定方法。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 ラットIgEの少なくとも一部を認識する抗体を含む、対象試料中のラットIgEを測定するための測定キット。

【請求項2】 前記抗体として、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体の二種類の組み合わせを使用する、請求項1に記載の測定キット。

【請求項3】 前記ポリクローナル抗体がF(ab')₂又はFab'の形態である、請求項2に記載の測定キット。

【請求項4】 測定方法としてエンザイムノアッセイを用いる、請求項1ないし3のいずれか一項に記載の測定キット。

【請求項5】 測定方法としてラジオイムノアッセイを用いる、請求項1ないし3のいずれか一項に記載の測定キット。

【請求項6】 測定方法としてフルオロイムノアッセイを用いる、請求項1ないし3のいずれか一項に記載の測定キット。

【請求項7】 測定方法としてケミルミネッセンスイムノアッセイを用いる、請求項1ないし3のいずれか一項に記載の測定キット。

【請求項8】 測定方法として時間分解蛍光免疫測定法を用いる、請求項1ないし3のいずれか一項に記載の測定キット。

【請求項9】 測定方法として粒子の凝集を指標とするイムノアッセイを用いる、請求項1ないし3のいずれか一項に記載の測定キット。

【請求項10】 前記粒子がラテックス粒子である、請求項9に記載の測定キット。

【請求項11】 ラットIgEの少なくとも一部を認識する抗体を用いることを特徴とする、対象試料中のラットIgEを測定する方法。

【請求項12】 前記対象試料が、血漿、血清または細胞培養上清から選ばれる、請求項11に記載の測定方法。

【請求項13】 対象試料中に含まれる1ng/ml以上のラットIgEが検出可能である、請求項11に記載の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、ラットイムノグロブリンE (IgE) を認識する抗体を含む、対象試料中のラットIgEを測定する測定キット、及びラットイムノグロブリンE (IgE) を認識する抗体を用いる、対象試料中のラットIgEを測定する方法に関する。ラットIgEを測定して得られる結果は、ラットを用いた動物モデル実験における各種アレルギー疾患の病勢や薬剤による治療効果、および予知、診断に有用な情報を提供する。

【0002】

【従来の技術】 生体内に異物が侵入したとき、それを排除しようとする免疫反応が起こる。この免疫反応が生体

に対して様々な病気をもたらす場合をアレルギーと呼び、現在このアレルギー反応の作用機序によりI型からV型の5種類に分類されている。近年では、乳幼児を中心としてアトピー性皮膚炎に代表される種々のアレルギー疾患患者が激増し、社会問題となっているが、これらのアレルギー疾患の多くはアレルギーに反応するIgEが過剰に産生されることにより発症する即時型 (I型) アレルギーと呼ばれている。

【0003】 一般的に、アレルギーを発症していない状態では血中IgE濃度はおよそ数ng/mL程度と極めて微量に保たれているが、いったんアレルギーを発症すると血中IgE濃度はこれの数十倍から数千倍に増加する。大量に産生されたIgEは肥満細胞上のリセプターに結合し、さらに体内に侵入したアレルギーによって細胞膜上で架橋されることにより肥満細胞からヒスタミンなどの炎症因子が血中に放出されてアレルギー疾患を発症すると考えられている。

【0004】 このI型アレルギーの治療を最終目標としてIgE産生調節メカニズムを解明する研究が盛んに行われており、肥満細胞から放出されるヒスタミンやロイコトリエンなどのケミカルメディエーターによる炎症反応を抑える薬剤や、IgEとリセプターとの結合を阻害する薬剤などの開発が進められている。

【0005】 このため、血中のIgE量を定量することはI型アレルギー疾患、特にアトピー性疾患においては重要な診断基準となる。また、寄生虫感染、重症肝障害、湿疹、IgEミエローマでも上昇することが知られており、血中IgE量を定量することはこれらの疾患を判別することにも役立つ。

【0006】 ヒト血中IgEの測定方法は、ヒトIgEに対する抗体を組み合わせたELISA系やRIA系により測定することが可能であり、サンドイッチ法や競合法により行われている。また、肥満細胞や好塩基球上に存在するIgEリセプター (FcεRI 及びFcεRII) との結合を応用したアレルギーの発症に関与するIgEの測定方法も開発されている (特開平7-072150 (特願平6-218920)、特開平8-101194 (特願平6-237590))。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】 動物モデルとしては、一般にマウスが用いられており、マウスIgEを測定する試薬類は既に市販されている。一方、抗ラットIgE抗体そのものは市販されているものの、対象試料中のラットIgEを高感度で測定するための測定キットないし測定方法は当該技術分野で未だ知られておらず、各研究室においては独自の方法を用いて測定を行っているのが現状である。又、その測定感度も充分であるとは言いがたい。そこで、本発明者等は、操作が簡便で、測定精度および測定感度、再現性が優れ、将来的に広く一般的に使用されることを目的としたラットIgEの測定系 (キット) を開発すべく、鋭意研究を進めてきた。

10

20

30

40

50

【0008】その結果、ラットIgEを認識する抗体を用い、対象試料中のラットIgEを測定するための、簡便で、測定精度、測定感度および再現性に優れている測定キット及び測定方法を見出し、本発明を完成させた。

【0009】

【課題を解決するための手段】即ち、本発明は、ラットIgEの少なくとも一部を認識する抗体を含む、対象試料中のラットIgEを測定する測定キットに係わる。本発明は、更に、ラットIgEの少なくとも一部を認識する抗体を用いる、対象試料中のラットIgEを測定する方法に係わる。該測定方法は、本発明の測定キットを使用して行うことが好ましい。

【0010】

【発明の実施の形態】以下に、本発明を詳細に説明する。本発明に於いて、ラットIgEとはラット血中に存在する全てのIgEを指す。即ち、血中には遊離のIgEとして肥満細胞や好塩基球上のIgEリセプター(FcεRIおよびFcεRII)に結合するものと、それらリセプターには結合しないものが存在するが、その何れであってもよく、あるいは、これらの混合物であってもよい。また、ラットB細胞やラットミエロマ細胞などのラットIgEを産生する細胞を人為的に培養した培養上清中に遊離されるIgEでもよい。更に、B細胞のmRNA等を用いて遺伝子工学的に作製したリコンビナントのラットIgEでもよい。

【0011】本発明の測定方法は、ラットIgEの少なくとも一部を認識する抗体を用いることを特徴とするが、以下にこの抗体について説明する。本発明で用いる抗体は、前述のラットIgEを抗原として認識し得る抗体であればいかなるものでも良い。従って、本発明で用いる抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であっても良い。尚、固相化抗体としてポリクローナル抗体を使用する場合には、抗体の非特異的反応を抑える為に、精製したラットIgEを固相化したカラム等を使用して特異的に精製したものが好ましい。又、遺伝子工学的に作成されるキメラ抗体等であっても良い。更に、以上の抗体にペプシン、パバイン等のタンパク質分解酵素を作用させ、抗体のFc部分を除去して得られる、F(ab')₂、Fab'、Fab等のフラグメントも本発明で使用する抗体に含まれる。これらフラグメントは、抗体のFc部分がない為にマイクロタイタープレート等の固相への非特異的結合が低く、本発明において酵素等の化学物質で標識して使用する標識抗体として好ましい。高測定感度を得る為には、特に、F(ab')₂を標識抗体として使用することが好ましい。例えば、固相サンドイッチ法などのような二段階の抗原抗体反応を行う測定方法においては、担体へのコーティングに用いられる固相化抗体（一次抗体）としてはポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体、標識二次抗体としてはポリクローナル抗体由来のフラグメント、というように二種類以上の抗体を使用することが出来る。

【0012】本発明で用いる抗体は、B細胞のmRNA等を用いて遺伝子工学的に作製したり、動物に免疫する等の当業者に公知の如何なる方法で作製することができるが、抗体の作製方法として、以下の方法が一般的である。まず、ラットIgE、もしくはその一部を免疫原として用い、動物に免疫する。ここで用いる免疫原は、前述のラットIgEを認識する所望の抗体が得られるようなものであればよく、ラットIgE全体であっても一部であってもよく、また、天然であっても人工的に作製されたものであってもよい。

【0013】免疫原として用いるラットIgEを天然から得る場合は、IgEを含むラット血清画分あるいは血漿画分から塩析、透析やアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー等各種クロマトグラフィーを用いて精製することが可能である。また、IgEを産生するラットミエロマ細胞等、適当な細胞を培養し、その培養上清から精製することも可能である。

【0014】ラットIgEを人工的に作製するには、所望のラットIgEのアミノ酸配列をコードするDNAを作製し、該DNAで適当な宿主細胞を形質転換し、形質転換された宿主細胞の培養上清から回収すればよい。

【0015】上記のようにして得たラットIgEを免疫原とする動物の免疫に際して有用な免疫動物は、ウサギ、モルモット、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ニワトリ、マウス等の温血動物である。また、これらの動物を免疫する方法は、当該技術分野で通常行われている方法でよい。尚、二種類の抗ラットIgE抗体を使用するような場合には、それぞれ別の免疫原に由来するものを使用することも出来る。

【0016】次に、免疫した動物から抗体を得るのであるが、この方法も、当該技術分野で従来公知の方法によればよい。その一例を挙げると、下記のとおりである。

【0017】目的の抗体がポリクローナル抗体である場合は、免疫した動物から得られる抗血清を既存のプロテインGカラムに供し、カラム吸着画分をグリシン塩酸緩衝液等の酸性緩衝液で溶出してIgG画分を回収したのち、透析等によって目的の溶媒に置換する。次に、この画分に抗ラットIgE活性があるか否かを判定する。判定の具体的方法としては、公知の酵素免疫測定法に従い、プレートに吸着した抗原に抗体を反応させ、これに酵素標識した二次抗体を反応させ、酵素の作用による基質の発色反応で酵素活性を測定する方法、あるいはラジオアイソトープで標識された抗原を用いる公知のラジオイムノアッセイ法等が例示されるが、公知の各種の方法を用いることが可能である。

【0018】また、モノクローナル抗体を調製する場合は、免疫した動物の脾細胞とミエロマ細胞株などの細胞融合用のペアレントセルを融合させ、得られる融合細胞（ハイブリドーマ）の中から好適なものを選択してク

ローン化し、次いで、その融合細胞を生体外または生体内で培養し、この培養混合物より特異性の高いモノクローナル抗体を採取する。

【0019】上記のようにして得た抗体は、必要に応じて精製を行う。精製方法は、塩析、透析、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の公知の方法を任意に組み合わせればよい。

【0020】本発明の測定キットでは、上記のようにして得た抗体を含むが、該抗体は、例えば、固相化抗体及び／又は標識抗体として、対象試料中の被検物質であるラットIgEとの抗原抗体反応によって、対象試料中の被検物質ラットIgEをトラップする為に使用されることが望ましい。標識抗体及びラットIgE標準品は、溶液又は凍結乾燥等の各種形態で提供することが出来る。固相化抗体は、ビーズ、マイクロタイタープレート、試験管、ニトロセルロース膜、ナイロン膜等の固相化担体表面に、当業者には公知の方法によって、ラットIgEの少なくとも一部を認識する抗体を結合させることによって調製される。本発明の測定キットは、以下に記載する測定方法・検出原理に応じて、ラットIgEの少なくとも一部を認識する各種抗体に加えて、様々な試薬、材料、器具等を適宜含有するものである。例えば、各種固相化担体（測定に際して測定者自らが固相化抗体を調製するような場合）、ラットIgE標準品、検出用試薬、検出用基質、血清、反応媒体又は試料用の希釈液等、当業者には公知のものを挙げることが出来る。

【0021】本発明の測定キット及び測定方法は、以上に説明したように、試料中のラットIgEを測定することを目的としている。この場合、対象試料は血液、血漿、血清およびIgE産生細胞の培養上清等が好ましいが、ラットIgEを含む溶液であれば、これらに限定されるものではない。尚、本発明の測定方法において、抗原抗体反応をラットIgE非含有血清の存在下で実施することが好ましい。ここで、「ラットIgE非含有（フリー）血清」とは、ラットIgEを実質的に含まない（本発明測定方法の検出感度以下のラットIgEしか含まない）ような血清を意味する。抗原抗体反応溶液中の該ラットIgE非含有血清の最終濃度は、当業者が適宜決めることができ、例えば、5容量%～80容量%が適当である。かかるラットIgE非含有血清は、ウサギ、モルモット、ラット、マウス、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ブタ、ニワトリ等の温血動物の血清を抗ラットIgE抗体を固相化した樹脂に通してラットIgEを吸収する等の当業者に公知の方法で調製することが出来る。ラットIgE非含有血清は、例えば、抗原抗体反応に際して、その系に直接加えても良いし、ラットIgEを含む対象試料（検体）又は標識抗体を希釈する為の希釈溶液等に予め含有させておくことも出来る。

【0022】本発明の測定キット及び測定方法で用いる被検物質の測定方法及び検出原理は特定のものに限定されない。測定方法として、凝集法、サンドイッチ法、競

合法、及び、固相直接法等を挙げることができる。

【0023】凝集法では、抗体を粒子、例えばラテックス粒子や赤血球の表面に結合させ、ラットIgEが存在すると粒子の凝集が生じるようにし、この粒子の凝集の程度を指標としてラットIgEを測定する。なお、この凝集法では、ラテックスや赤血球以外にも、ゼラチンやマイクロビーズ、カーボン粒子等、一般に用いられている粒子を使用することができる。

【0024】また、サンドイッチ法、固相直接法、競合法では、標識された抗体や抗原を使用し、エンザイムノアッセイ（EIA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、ケミルミネセンスイムノアッセイ（化学発光免疫測定法）、フルオロイムノアッセイ（蛍光免疫測定法）、時間分解蛍光免疫測定法（TR-FIA）等の原理で測定を行うことが出来る。

【0025】以下に、本発明の好適例として、EIAの原理に基づく固相サンドイッチ法を説明する。EIAによる固相サンドイッチ法ではまず、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ等の酵素で標識した、ラットIgEを認識する抗体を準備する。また、使用する固相にはラットIgEを認識する抗体を吸着させておく。次に固相の抗体非吸着面を、その反応系には影響しないタンパク質、例えばBSA（ウシ血清アルブミン）などでブロッキング処理を行う。サンプル（試料）もしくはスタンダードを固相に添加し、第一ステップの抗原抗体反応を行わしめる。反応後、固相を洗浄し、上述の酵素標識抗体を添加して固相化抗体と反応したラットIgEと、第二ステップの抗原抗体反応を行わしめる。なお、サンプル（試料）もしくはスタンダードと酵素標識抗体を同時に添加することも可能である。過剰の酵素標識抗体を洗浄操作で除去した後、使用する酵素に応じた発色基質、例えば1,2-フェニルジアミンと H_2O_2 、p-ニトロフェニルリン酸、2-ニトロフェニル- β -D-ガラクトシド、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン等を加えて酵素と反応させる。基質の発色は、酵素量、ひいてはサンプル中のラットIgE物質濃度に依存するので、発色最終産物の量を測定することにより、ラットIgEを定量することが出来る。

【0026】固相直接法では、サンプル（試料）を直接固相に吸着させ、固相のラットIgE非吸着面を、その反応系には影響しないタンパク質、例えばBSA（ウシ血清アルブミン）などでブロッキング処理し、次いでラットIgEを認識する酵素標識抗体を添加、反応させる。以降は、固相サンドイッチ法と同様の操作を行い、サンプル中のラットIgEの有無を判定するか、定量を行う。

【0027】固相競合法では、使用する抗体が認識する一定量のラットIgEを直接固相に吸着させ、次いでブロッキング処理をした後、ここにラットIgEを認識する酵素標識抗体とサンプル（試料）とを添加する。一定時間反応させた後、洗浄して固相に非結合の物質を除去し、発色基質を加えて酵素と反応させる。反応後、サンプル添

加による、酵素標識抗体の固相ラットIgEへの結合阻害度を測定することにより、サンプル中のラットIgEを定量する。尚、はじめに抗体を固相に吸着させ、酵素標識したラットIgEをサンプル(試料)と同時に添加し、サンプル添加による、標識物の固相化抗体への結合阻害度を測定することにより、サンプル(試料)中のラットIgEを定量しても良い。

【0028】上記以外の方法として、抗原抗体反応を固相ではなく液相で行い、後に、抗体を用いた凝集沈降法もしくは物理化学的な手法によって、標識抗体と結合したラットIgEを不溶化して定量する方法もある。また、ラットIgEを認識する抗体を標識するのではなく、その抗体を認識する二次抗体を得、それを標識し、抗原抗体反応を行わせて、ラットIgEを測定することも可能である。

【0029】サンドイッチ法、固相直接法、競合法のいずれにおいても、標識酵素-発色基質の組み合わせを、標識酵素-生物発光基質または化学発光基質、標識酵素-蛍光基質等の組み合わせに変えることが可能である。この場合の、酵素-発光基質の代表的な組み合わせは、アルカリフォスファターゼ-AMPPD、ホースラディッシュペルオキシダーゼ-ルミノール、ルシフェラーゼ-ルシフェリン等があり、酵素-蛍光基質の代表的な組み合わせは、アルカリフォスファターゼ-ウンベリフェリルフォスフェート、ホースラディッシュペルオキシダーゼ-p-ハイドロキシフェニルプロピオン酸等がある。

【0030】さらに、上記3種の測定方法において、酵素に代わって、放射性物質や化学発光物質あるいは蛍光物質で直接あるいは間接的に標識された抗体や抗原を用い、放射能や発光、蛍光の強度を測定することにより、サンプル(試料)中のラットIgEを測定することも可能である。放射性物質としては、 ^{125}I や ^{131}I 等が一般に使用されており、化学発光物質の代表的なものには、アクリジニウムエステル等がある。また、蛍光強度を測定する場合には、より高感度な方法として、抗体あるいは抗原にキレート剤を直接あるいは間接的に結合させ、励起光照射後にそのキレート剤から発せられる蛍光の強度を時間分解的に測定することにより、試料中のラットIgEを測定する方法(時間分解蛍光免疫測定法)も有用である。尚、代表的な希土類金属の例として、ユーロピウムがあげられる。

【0031】本発明の各測定方法におけるその他の反応条件等は、その目的・対象試料の種類・測定原理等に応じて、当業者が適宜決定することが出来る。

【0032】以下の実施例で示されるように、本発明の測定キットを使用する検出系・測定方法は、ラット血清中のIgEを測定することにおいて非常に安定な系である。更に、測定に必要な対象試料は、わずか数 μl という微量なもので充分であり、且つ、数 ng/ml 以上、例えば、 1 ng/ml 以上のラットIgEが検出可能であるような高

感度なものである。以上、説明した本発明の測定キット及び測定方法は、ラットを用いた動物モデル実験における各種アレルギー疾患の病勢や薬剤による治療効果、および予知、診断に有用な情報を提供する。

【0033】

【実施例】以下に、実施例をもって本発明をよりいっそう具体的に説明するが、これらは実施例の一例として示すものであり、本発明はこれらにより何等限定されるものではない。なお、記載に用いる略号は、当該技術分野における慣用略号によるものである。

【0034】

【実施例1】ELISAの原理に基づく、ポリクローナル抗体を固相化したサンドイッチ法による測定
ELISAの原理に基づく、ポリクローナル抗体を固相化したサンドイッチ法によるラットIgEの測定系を以下のようにつく製した。なお、固相化抗体は、精製したラットIgEを固相化したカラムを使用した公知の方法により特異精製したものをを用いた。尚、上記測定系で使用する酵素標識抗体については、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヒツジIgG抗ラットIgE抗体、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヒツジFab'抗ラットIgE抗体、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヒツジF(ab')₂抗ラットIgE抗体を調製し、比較した。

【0035】その1:

西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヒツジIgG抗ラットIgE抗体の調製

西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヒツジIgG抗ラットIgE抗体は中根らの方法(J. Histochem. Cytochem., 22:1084-1091, 1974)に準じ調製した。即ち、過ヨウ素酸で活性化した西洋ワサビペルオキシダーゼ(4 mg/ml , 0.3M NaHCO₃に溶解)と、ヒツジIgG抗ラットIgE(2 mg/ml)を等重量ずつ混合し、常温、遮光下で6~8時間インキュベーションした。その後、カップリングを行った総タンパク重量と等重量の水素化ホウ素ナトリウムを加え、4°Cで一晩放置した。20mM Tris-HCl, 150mM NaCl (pH7.4)に一晩透析し、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヒツジIgG抗ラットIgE抗体を調製し、以下の測定に使用した。

(1) 抗ラットIgE抗体の担体へのコーティング

特異精製したヒツジ抗ラットIgEポリクローナル抗体を炭酸緩衝液(pH9.6)に1 $\mu\text{g/ml}$ となるように溶解した。これをマイクロタイタープレート(Nunc社、マイクロモジュールプレート、Maxsorp-F8)に100 μl ずつ分注し、4°Cで一晩放置した。

(2) マイクロタイタープレートのプロッキング

各ウェルを300 μl の洗浄液(150mM NaCl, 0.05% Tween20を含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4))で3回洗浄後、プロッキング溶液(0.1% BSA(オリエンタル酵母社製)を含む150mM NaCl, 0.05% Tween20を含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4))300 μl を加え常温で2時間放置した。

(3) ラットIgEの測定

10

20

30

40

50

各ウェル中のブロッキング溶液を除去後、各ウェルに検体希釈溶液(30%ラット血清(IgEフリー)を含む、0.1% BSA, 150mM NaCl, 0.05% Tween20含有20 mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4))を95 μ l分注した。ここに、検体血清を5 μ l加え、常温で4時間放置した。標準ラットIgEとしては、ラットミエローマ細胞由来精製IgEを用い、これを検体希釈溶液で2倍段階希釈し、同様に各ウェルに5 μ l加え、常温で4時間放置した。各ウェルを洗浄液300 μ lで5回洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヒツジIgG抗ラットIgEポリクローナル抗体を30%ラット血清(IgEフリー)を含む、0.1% BSA, 150mM NaCl, 0.05% Tween20含有20 mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)で希釈し、100 μ lずつ加え、常温で2時間放置した。次に、各ウェルを洗浄液300 μ lで5回洗浄後、TMB溶液(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)を100 μ lずつ加え、常温で遮光し30分間反応させた。その後、1規定硫酸を100 μ lずつ加え反応を停止させた。各ウェルの吸光度をマイクロプレートリーダーを用いて主波長450nm、副波長630nmで測定した。実際に検体中のIgE量を測定する場合は、これをラットIgE標準曲線とし検体中のIgE量を換算した。図1に示すように、上記の操作で調整した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヒツジIgG抗ラットIgE抗体を用いると、5 μ lのラット血清使用時には8 ng/ml以上のラットIgEが検出可能であった。

【0036】その2:

西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヒツジFab' 抗ラットIgE特異抗体の調製

特異精製ヒツジFab' 抗ラットIgE抗体はHashidaらの方法(J. Immunoassay, 6:111-123, 1985)に準じ、以下のように調製した。ヒツジIgG抗ラットIgE画分 10mgを0.1M 酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)-0.1M NaClに一晩透析した後、ブタペプシンを終濃度4%となるように添加し37 $^{\circ}$ C、24時間インキュベーションした。酵素消化後、反応液に0.5M リン酸二水素ナトリウムを500 μ l添加しpHを6.0に合わせた。さらに、0.1M 2-メルカプトエチルアミン含有0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 pH6.0 -5mM EDTAを500 μ l添加し、37 $^{\circ}$ C、2時間インキュベーションした。0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 pH7.0 -0.2M NaCl -5 mM EDTAを16ml添加し、同緩衝液で平衡化したラットIgE固相化カラム(1 ml)に流速0.1ml/minで供した。同緩衝液で十分洗浄した後、0.1M グリシン塩酸緩衝液 pH2.3 で溶出し、溶出画分のpHを中性付近に調整した後、0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 pH7.0-1 mM EDTA-0.15M NaClに一晩透析した。透析後、マレイミド化ポリペルオキシダーゼ(SIGMA社製)を重量比1:1で混合し、常温で3時間放置した。さらに、終濃度1.5mMとなるように2-メルカプトエタノールを添加し、そのまま15分放置した。最後に終濃度3 mMとなるようにN-エチルマレイミドを添加し、そのまま15分放置した。上記の操作で得られた反応混液をSuperose 12(Pharmacia製)でゲル濾過を行い、西洋ワサ

ビペルオキシダーゼ標識ヒツジFab' 抗ラットIgE特異抗体画分を回収した。このようにして調製した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヒツジFab' 抗ラットIgE特異抗体を用いる以外は、上記その1の測定系と同様な操作を行なって得られたラットIgE標準品の検量線を図2に示す。図2に示すように、上記の操作で調整した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヒツジFab' 抗ラットIgE特異抗体を用いると、5 μ lのラット血清使用時には5 ng/ml以上のラットIgEが検出可能であった。

【0037】その3:

西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヒツジFab' 2抗ラットIgEポリクローナル抗体の調製

ヒツジ抗ラットIgE抗血清から得られたIgG画分を0.1M 酢酸ナトリウム緩衝液(0.15M NaClを含む)に一晩透析する。同緩衝液で5~10mg/mlとなるように調製し、同緩衝液で溶解したブタペプシンを終濃度2%となるように添加した。37 $^{\circ}$ Cに保たれたインキュベーターで24時間インキュベーションし酵素消化を行った。酵素消化後、0.3M NaHCO₃で平衡化したSuperose 12カラム(Pharmacia製)で分離を行い、F(ab')₂画分を回収した。回収されたF(ab')₂画分は2mg/mlに濃度調整したのち、過ヨウ素酸化性化西洋ワサビペルオキシダーゼとヒツジFab' 2抗ラットIgE抗体を等重量ずつ混合し、常温、遮光下で6~8時間インキュベーションした。その後、カップリングを行った総タンパク重量と等重量の水素化ホウ素ナトリウムを加え、4 $^{\circ}$ Cで一晩放置し、更に、20mM Tris-HCl, 150 mM NaCl (pH7.4)に一晩透析した。このようにして調製した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヒツジFab' 2抗ラットIgEポリクローナル抗体を用いる以外は、上記その1の測定系と同様な操作を行なって得られたラットIgE標準品の検量線を図3に示す。図3に示すように、上記の操作で調整した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヒツジFab' 2抗ラットIgE抗体を用いると、5 μ lのラット血清使用時には2 ng/ml以上のラットIgEが検出可能であった。以上の結果から、本測定キットに使用する酵素標識抗体は西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヒツジFab' 2抗ラットIgE抗体が最適であると判断した。

【0038】

【実施例2】ELISAの原理に基づく、モノクローナル抗体を固相化したサンドイッチ法による測定

ELISAの原理に基づく、モノクローナル抗体を固相化したサンドイッチ法によるラットIgEの測定系を以下のよう

(1) 抗ラットIgE抗体の担体へのコーティング

抗ラットIgEマウスモノクローナル抗体(Crystal Chem Inc. 製)を炭酸緩衝液(pH9.6)に1 μ g/mlとなるように溶解した。これをマイクロタイタープレート(Nunc社、マイクロモジュールプレート、Maxsorp-F8)に100 μ lずつ分注し、4 $^{\circ}$ Cに一晩放置した。

(2) マイクロタイタープレートでのブロッキング

各ウェルを300 μ lの洗浄液(150mM NaCl, 0.05% Tween20を含む20 mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4))で3回洗浄後、ブロッキング溶液(0.1% BSA(オリエンタル酵母社製)を含む150mM NaCl, 0.05% Tween20含有20 mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4))300 μ lを加え常温で2時間放置した。

(3) ラットIgEの測定

各ウェル中のブロッキング溶液を除去後、各ウェルに検体希釈溶液(30%ラット血清(IgEフリー)を含む、0.1% BSA, 150mM NaCl, 0.05% Tween20含有20 mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4))を95 μ l分注した。ここに、検体血清を5 μ l 10 加え、常温で4時間放置した。標準ラットIgEとしては、ラットミエローマ細胞由来精製IgEを用い、これを検体希釈溶液で2倍段階希釈し、同様に各ウェルに5 μ l加え、常温で4時間放置した。また、この系で測定範囲以外の検体については予め検体希釈溶液で希釈してから測定した。各ウェルを洗浄液300 μ lで5回洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヒツジF(ab')₂抗ラットIgEポリクローナル抗体を30%ラット血清(IgEフリー)を含む、0.1% BSA, 150mM NaCl, 0.05% Tween20含有20 mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)で希釈し、100 μ lずつ加え、常 20 温で2時間放置した。次に、各ウェルを洗浄液300 μ lで5回洗浄後、TMB溶液(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)を100 μ lずつ加え、常温で遮光し30分間反応させた。その後、1規定硫酸を100 μ lずつ加え反応を停止させた。各ウェルの吸光度をマイクロプレートリーダーを

用いて主波長450nm、副波長630nmで測定した。図4に標準ラットIgEの2倍段階希釈したものの希釈直線性を示す。良好な希釈直線性を示している。なお、本測定系を用いると、5 μ lのラット血清を用いることにより1ng/ml以上のラットIgEが検出可能であった。以上の結果から、本発明のラットIgE測定キットにおいて、マウスIgG抗ラットIgEモノクローナル抗体を固相化抗体として用い、酵素標識抗体としてヒツジF(ab')₂抗ラットIgE抗体を用いることによって、測定感度の最も高いキットを汲むことが出来た。

【0039】

【実施例3】ラットIgE測定キットの基礎性能試験

(1) ラット血清検体の希釈試験

上記の試験法に従ってラットIgEの希釈試験を行った。図5に示すとおり、血清使用量5 μ l以下においては、ほぼ良好な直線性が得られている。

(2) 添加回収試験

上記の試験法に従ってラットIgEの添加回収試験を行った。血清検体9検体に標準ラットIgEを添加し、測定値から添加したIgE量の回収率を求めた。表1に示すとおり、添加回収率は85.7%から125.0%(平均値99.7%)と良好な結果が得られている。

【0040】

【表1】

【表1】

添加回収試験

	検体中IgE濃度(ng/mL)	IgE添加量(mg/mL)	測定値(ng/mL)	添加回収率(%)
検体1	28.0	1.6	28.4	87.5
検体2	9.8	1.6	11.4	112.6
検体3	2.7	1.6	4.6	118.8
検体4	22.1	1.6	23.6	93.8
検体5	7.8	1.6	9.8	112.5
検体6	2.2	1.6	4.1	118.8
検体7	25.4	1.6	26.9	93.8
検体8	10.4	1.6	11.8	93.8
検体9	3.4	1.6	5.4	125.0

	検体中IgE濃度(ng/mL)	IgE添加量(mg/mL)	測定値(ng/mL)	添加回収率(%)
検体1	28.0	8.3	33.6	88.9
検体2	9.8	8.3	15.5	93.7
検体3	2.7	8.3	8.8	88.8
検体4	22.1	8.3	27.5	85.7
検体5	7.8	8.3	13.8	95.2
検体6	2.2	8.3	8.7	103.2
検体7	25.4	8.3	31.2	92.1
検体8	10.4	8.3	18.1	90.5
検体9	3.4	8.3	10.6	112.7

	検体中IgE濃度(ng/mL)	IgE添加量(mg/mL)	測定値(ng/mL)	添加回収率(%)
検体1	28.0	11.1	38.1	91.0
検体2	9.8	11.1	20.0	93.7
検体3	2.7	11.1	13.3	85.5
検体4	22.1	11.1	32.3	91.9
検体5	7.8	11.1	18.4	95.5
検体6	2.2	11.1	13.3	100.0
検体7	25.4	11.1	36.2	87.3
検体8	10.4	11.1	21.8	102.7
検体9	3.4	11.1	15.8	109.9

添加回収率平均値 89.70%

【0041】(3) 同時再現性試験 を示している。

上記の試験法に従って同時再現性試験を行った。表2に 30 【0042】

結果を示すとおり、CV値は10%以下で良好な同時再現性 【表2】

【表2】

同時再現性試験

	測定1	測定2	測定3	平均値(ng/ml)	標準偏差	C.V.値(%)
検体1	30.8	32.8	31.5	31.6	1.1	3.5
検体2	203.1	218.8	214.7	211.5	7.4	3.5
検体3	52.3	53.8	53.8	53.3	0.9	1.6
検体4	69.0	73.2	70.1	70.8	2.2	3.1

平均C.V.値(%)= 2.9

【0043】(4) 日差再現性試験 を示している。

上記の試験法に従って日差再現性試験を行った。表3に 【0044】

結果を示すとおり、CV値は10%以下で良好な日差再現性 【表3】

【表3】

日差再現性試験

	1日目	2日目	3日目	平均値 (ng/ml)	標準偏差	C.V.値 (%)
検体1	32.3	32.9	30.5	31.9	1.2	3.9
検体2	192.9	211.6	214.3	208.3	11.7	5.7
検体3	59.5	53.1	53.9	55.5	3.5	6.3
検体4	77.7	74.0	74.6	75.4	2.0	2.6

平均C.V.値 (%) = 4.6

【0045】(3)および(4)の結果から、この検出系がラット血清中のIgEを測定することにおいて非常に安定な系であることを示している。

【0046】

【発明の効果】以上の結果から、本発明の測定キットを使用する検出系は、ラット血清中のIgEを測定することにおいて非常に安定な系であることを示している。更に、本測定キット又は測定方法を用いると、わずか5 μ lのラット血清を用いることにより1ng/ml以上のラットIgEが検出可能であった。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、ラットミエローマ由来標準IgEを2倍段階希釈により希釈し、本発明方法(EIA)の原理に基づき、固相化抗体としてポリクローナル抗体を使用し、標識抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヒツジ IgG 抗ラットIgE抗体を使用した固相サンドイッチ法により、測定波長450nm、副波長630nmでの吸光度を測定した結果を示すグラフである。

【図2】図2は、ラットミエローマ由来標準IgEを2倍段階希釈により希釈し、本発明方法(EIA)の原理に基づき、固相化抗体としてポリクローナル抗体を使用し、標

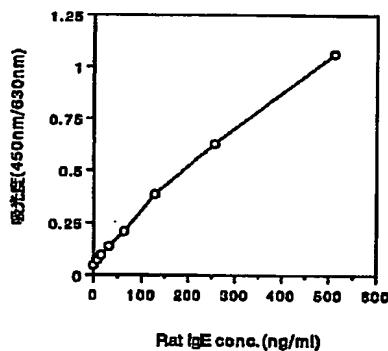
識抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヒツジ Fab' 抗ラットIgE抗体を使用した固相サンドイッチ法により、測定波長450nm、副波長630nmでの吸光度を測定した結果を示すグラフである。

【図3】図3は、ラットミエローマ由来標準IgEを2倍段階希釈により希釈し、本発明方法(EIA)の原理に基づき、固相化抗体としてポリクローナル抗体を使用し、標識抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヒツジ Fab' 抗ラットIgE抗体を使用した固相サンドイッチ法により、測定波長450nm、副波長630nmでの吸光度を測定した結果を示すグラフである。

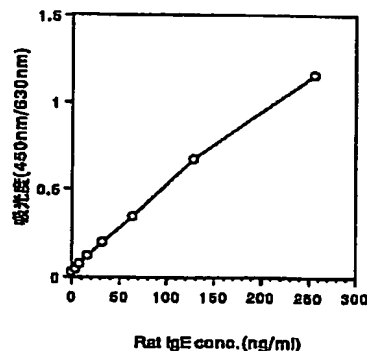
【図4】図4は、ラットミエローマ由来標準IgEを2倍段階希釈により希釈し、本発明方法(EIA)の原理に基づき、固相化抗体としてモノクローナル抗体を使用し、標識抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヒツジ Fab' 抗ラットIgE抗体を使用した固相サンドイッチ法により、測定波長450nm、副波長630nmでの吸光度を測定した結果を示すグラフである。

【図5】図5は、ラットIgEの希釈試験の結果を示すグラフである。

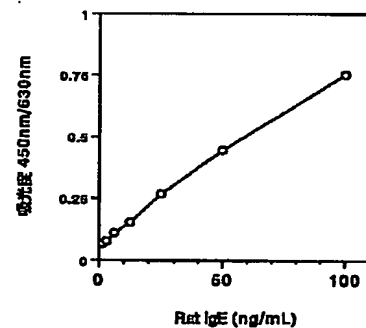
【図1】



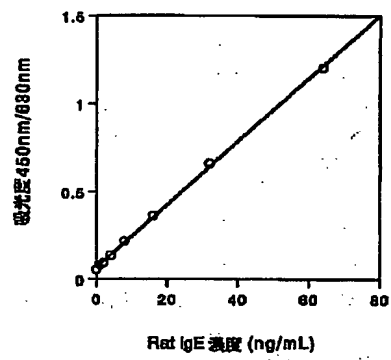
【図2】



【図3】



【図4】



【図5】

